

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-245342

(43) 公開日 平成10年(1998) 9月14日

(51) IntCl.<sup>8</sup>

A 6 1 K 35/78

識別記号

F I

A 6 1 K 35/78

C

X

31/35

A A A

31/35

A A A

A A M

A A M

A E D

A E D

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平9-61761

(22) 出願日

平成9年(1997) 3月3日

(71) 出願人 591039137

三井農林株式会社

東京都中央区日本橋室町3丁目1番20号

(72) 発明者 新家 一男

東京都足立区足立1-5-7-703

(72) 発明者 瀬戸 治男

東京都八王子市上野町100-5

(74) 代理人 弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

(54) 【発明の名称】  $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤

(57) 【要約】

【課題】 日常的に飲用されており、安全性に全く問題のない茶の成分の生理作用について検討し、神経細胞に対する $\beta$ -アミロイド蛋白の毒性を低減する作用を有する物質を開発すること。

【解決手段】 茶ポリフェノール類を有効成分として含有する $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤並びに $\beta$ -アミロイド蛋白の毒性により神経細胞を侵されている患者に対して、請求項1記載の低減剤の有効量を投与することを特徴とする $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性を低減する方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 茶ポリフェノール類を有効成分として含有する $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤。

【請求項2】 茶ポリフェノール類が茶カテキン類及び／又はテアフラビン類である請求項1記載の神経細胞毒性低減剤。

【請求項3】 茶カテキン類及び／又はテアフラビン類がエピカテキンガレート、エピガロカテキンガレート、テアフラビン、テアフラビンモノガレートA、テアフラビンモノガレートB及びテアフラビンジガレートのうちの少なくとも1種である請求項2記載の神経細胞毒性低減剤。

【請求項4】  $\beta$ -アミロイド蛋白の毒性により神経細胞を侵されている患者に対して、請求項1記載の低減剤の有効量を投与することを特徴とする $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性を低減する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、 $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤及びその使用方法に関し、詳しくは茶ポリフェノール類を有効成分として含有する $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤並びに $\beta$ -アミロイド蛋白の毒性により神経細胞を侵されている患者に対して、該低減剤を投与して $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性を低減する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】近年高齢化社会を迎え、痴呆は社会的な問題となっている。その中でも、25%程度を占めるアルツハイマー型痴呆や、これよりさらに低年齢で発症するアルツハイマー病は、脳血管性痴呆と並んで老齢期痴呆の中核とも言える重要な疾患である。これらの痴呆は進行性で、治癒することは極めて困難であると考えられている。アルツハイマー型痴呆及びアルツハイマー病は、形態学的には大脳皮質や海馬に萎縮や脱落が認められる変性疾患で、その顕著な病理所見として(1)大脳皮質や海馬に存在する老人斑と $\beta$ -アミロイド蛋白の沈着及び(2)神経原線維の変化が挙げられる。

【0003】アルツハイマー病の発症機構としては、沈着した $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性に起因するという説が最も支持されている。この $\beta$ -アミロイド蛋白は、アミロイド前駆体蛋白質の一部で、細胞膜貫通ドメインと細胞外ドメインとにまたがるようにして存在し、神経細胞に対して毒性を示すことが知られている。そのため、神経細胞に対する $\beta$ -アミロイド蛋白の毒性を低減する化合物の検索が行われており、これまでにビタミンE (C. Behl, J. B. Davis, R. Lesley and D. Schubert, Cell, 77, 817-827 (1994))や生薬ガラナの成分である(+)-カテキン (国上他, 1996年度日本農芸化学会講演要旨集, p53 (1996))に毒性を低減させる効果があることが明らかになっている。

【0004】一方、茶に大量に含まれているポリフェノール類、特に茶カテキン類やテアフラビン類についても、その生理作用に関する研究がなされ、コレステロールの上昇抑制作用(特公平2-44449号公報)や $\alpha$ -アミラーゼ阻害作用(特公平3-133928号公報)などを有していることが報告されている。しかし、茶ポリフェノール類が神経細胞に対する $\beta$ -アミロイド蛋白の毒性を低減させる作用を有しているという報告は未だない。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、日常的に飲用されており、安全性に全く問題のない茶の成分の生理作用について検討し、神経細胞に対する $\beta$ -アミロイド蛋白の毒性を低減する作用を有する物質を開発することである。そこで本発明者らは、茶に含まれているポリフェノール類について、 $\beta$ -アミロイド蛋白のもたらす神経細胞毒性を低減する作用の有無を検討したところ、これらが強い $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減活性を有していることを見出し、本発明を完成するに至った。

## 【0006】

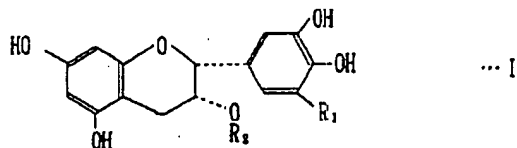
【課題を解決するための手段】請求項1記載の本発明は、茶ポリフェノール類を有効成分として含有する $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤である。請求項2記載の本発明は、茶ポリフェノール類が茶カテキン類及び／又はテアフラビン類である請求項1記載の神経細胞毒性低減剤である。請求項3記載の本発明は、 $\beta$ -アミロイド蛋白の毒性により神経細胞を侵されている患者に対して、請求項1記載の低減剤の有効量を投与することを特徴とする $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性を低減する方法である。

## 【0007】

【発明の実施の形態】本発明に用いる茶ポリフェノール類は、下記の一般式Iで表される茶カテキン類と一般式IIで表されるテアフラビン類であり、これらを単独で、もしくは組み合わせて用いることができる。

## 【0008】

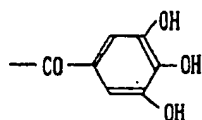
## 【化1】



【0009】(式中、 $R_1$ はHまたはOHを示し、 $R_2$ はHまたは

## 【0010】

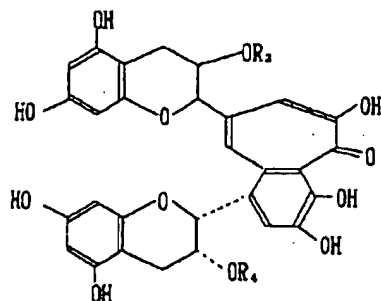
## 【化2】



【0011】を示す。）

【0012】

【化3】

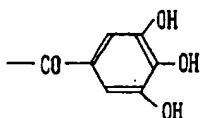


…II

【0013】(式中、 $R_3$  及び  $R_4$  はHまたは

【0014】

【化4】



【0015】を示し、 $R_3$  及び  $R_4$  は同じであっても異なってもよい。）

【0016】上記の一般式Iで表される茶カテキン類の具体例としては以下のものを挙げることができる。

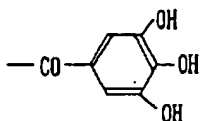
エピカテキン(EG)(一般式I中、 $R_1 = H$ ,  $R_2 = H$ のもの)

エピガロカテキン(EGC)(一般式I中、 $R_1 = O$ ,  $R_2 = H$ のもの)

エピカテキンガレート(EGg)(一般式I中、 $R_1 = H$ ,  $R_2 =$

【0017】

【化5】



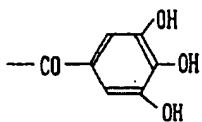
のもの)

【0018】エピガロカテキンガレート(EGcg)

(一般式I中、 $R_1 = OH$ ,  $R_2 =$

【0019】

【化6】



のもの)

【0020】次に、上記の一般式IIで表されるテアフラ

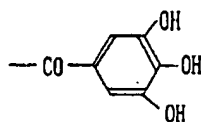
ビン類を具体的に示すと、以下のものがある。

遊離型テアフラビン(TF1)(一般式II中、 $R_3 = H$ ,  $R_4 = H$ のもの)

テアフラビンモノガレートA(TF2A)(一般式II中、 $R_3 =$

【0021】

【化7】

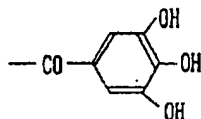


【0022】、 $R_4 = H$ のもの)

テアフラビンモノガレートB(TF2B)(一般式II中、 $R_3 = H$ ,  $R_4 =$

【0023】

【化8】

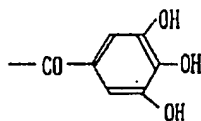


のもの)

【0024】テアフラビンジガレート(TF3)(一般式II中、 $R_3$ ,  $R_4 =$

【0025】

【化9】



のもの)

【0026】なお、上記茶ポリフェノール類には一般式I、IIで表される化合物と同一の平面構造で表すことのできる構造異性体も包含され、特に一般式Iで表される茶カテキン類のうちECを除く化合物の2位及び3位の配置がシス体又はトランス体のものや一般式IIで表されるテアフラビン類の2位、3位、2'位及び3'位の配置がシス体又はトランス体のものはすべて本発明に用いられる。本発明の神経細胞毒性低減剤の有効成分である茶ポリフェノール類の活性については、EC及びEGCが最も強い活性を示す濃度は、(+)ーカテキンと同じく50 $\mu$ Mである。しかし、ECgとEGcgはその1/5の濃度で、またTF1、TF2A、TF2B及びTF3は2/5の濃度で最も強い活性を示し、それぞれ(+)ーカテキンよりも5倍又は2.5倍高い活性を有している。

【0027】上記茶ポリフェノール類はEGcgやECgを主成分として含み、茶葉を原料として製造することができる。その製法は特開昭59-219384号公報、同60-13780号公報、同61-130285号公報などに記載されている。例えば、茶葉を熱湯、メ

タノールもしくはエタノール水溶液及びアセトン水溶液から選ばれた溶剤で抽出し、得られた抽出液を有機溶媒に転溶した後、有機溶媒を留去する方法がある。さらに、このようにして得られた抽出成分濃縮液を高濃度液体クロマトグラフィーにて上記各物質に分離することができる。茶葉としては各種形態のものを使用でき、例えば茶生葉、不発酵茶、半発酵茶、煎茶、インスタント緑茶などがあり、茶殻でもよい。なお、茶カテキン類は通常、茶葉に10%程度含まれており、テアフラビン類は紅茶に含まれ、紅茶のオレンジ色を決定づけている物質である。

【0028】本発明の $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤は、単独で使用する他、目的に応じて常用される補助的成分を適宜配合することができる。すなわち、適当な賦形剤、例えばゼラチン、アルギン酸ナトリウムなどと混合したり、水、アルコール類などの溶媒、カルボキシメチルセルロースなどの希釈剤等と組合わせて用いられる。本発明の $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤の経口及び非経口のいずれの形態でも投与することができる。例えば、経口投与する場合、飲料、食品をはじめとする各種飲食物や酒類などの嗜好品；うがい薬、歯磨き、トローチ、口中香錠等の口腔衛生品；内服液、散剤、粒剤、錠剤、カプセル等の医薬品；医薬部外品などの形態がある。また、非経口で投与する場合は、注射剤、点滴剤等の液剤の他、固形状や懸濁粘稠液状として座薬としても使用することができる。非経口での投与方法としては、局所組織内投与、注射剤として皮下、皮内、筋肉内、静脈注射などの他、局所への挿入、塗布、噴霧などの外用的投与も可能である。また、本発明の神経細胞毒性低減剤は、餌料、飼料などとして家畜、ペット類などに用いることもできる。

【0029】本発明の $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤の投与量については、その使用目的に応じて適宜決定すればよいが、有効成分の安全性が高いので、多量を継続的に投与しても副作用の心配はない。

【0030】

【実施例】次に、本発明を実施例により詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例1

妊娠18日齡ラット胎児の脳より調製した海馬神経細胞を、細胞濃度が $6 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>となるように96穴プレートに播種した。なお、培地としてDMEM培地（日水製薬株式会社製）にグルコースを0.5%添加したものにGMS-A supplement（GIBCO社製）を培地1リットル当たり1本添加した無血清培地を用いた。培養開始から8～10時間は、透析したFCS（牛胎児血清）（JRH BIOSCIENCE社製）を10%の濃度になるように添加し、その後は無血清培地に変えて37℃にて5日間培養した。

【0031】培養開始から5日後に培地を、茶ポリフェノール類（茶カテキン類又はテアフラビン類）の所定量を含んだ無血清培地に交換すると共に、終濃度が10 $\mu$ Mとなるように $\beta$ -アミロイド蛋白（BACHEM社製）を添加した。また、対照として $\beta$ -アミロイド蛋白のみを添加した無血清培地を用いた。これらの培地で37℃にて24～30時間培養後、MTT法（テトラゾリウム塩を用いた毒性試験法）〔動物実験代替法マニュアル、p.51-61、共立出版(1994)〕を用いて、海馬神経細胞の生存率を測定した。測定値は、 $\beta$ -アミロイド無添加の培地に培養した海馬神経細胞の生存数を100としたときの試験区及び対照区の生細胞数で表した。結果を第1表に示す。表中、A $\beta$ （-）は $\beta$ -アミロイド蛋白無添加区、A $\beta$ （+）は $\beta$ -アミロイド蛋白のみを添加した対照区、ECはエビカテキンの所定量を添加した試験区、EGCはエビガロカテキンの所定量を添加した試験区、EGCgはエビカテキンガレートの所定量を添加した試験区、EGCgはエビガロカテキンガレートの所定量を添加した試験区、TF1は遊離型テアフラビンの所定量を添加した試験区、TF2AはテアフラビンモノガレートAの所定量を添加した試験区、TF2BはテアフラビンモノガレートBの所定量を添加した試験区、TF3はテアフラビンジガレートの所定量を添加した試験区、（+）-Cは $\beta$ -アミロイド蛋白と50 $\mu$ Mの（+）-カテキンを添加した対照区をそれぞれ示す。

【0032】

【表1】

第1表 海馬細胞の生存率

試料名	試料の添加量 ( $\mu$ M)						(+) -C	A $\beta$ (+)	A $\beta$ (-)
	50	25	20	10	5	1			
EC	118.6						96.0	37.8	100
EGC	107.2	72.8			59.5	53.8	81.0	45.7	100
ECg				96.7			96.0	37.8	100
EGCg			108.2	110.7	77.0	56.5	81.0	45.7	100
TF1			93.1	59.7			88.8	50.9	100
TF2A			109.9	68.3			88.8	50.9	100
TF2B			109.2	63.2			88.8	50.9	100
TF3			118.8	69.0			88.8	50.9	100

【0033】表から明らかなように、茶カテキン類の場合は、EC又はEGCを50 $\mu$ M添加したとき、100%の海馬神経細胞が生存しており、茶カテキン類の主成分であるECg及びEGCgは10 $\mu$ Mの添加で100%の海馬神経細胞が生存していた。このことから、ガレート型のカテキン類の方が活性が強いことが分かる。一方、テアフラビン類の場合は、TF1がやや活性が弱いですが、いずれのテアフラビン類も20 $\mu$ Mの添加で100%の細胞が生存していた。このように、茶ポリフェノール類は比較的少量の添加によって、 $\beta$ -アミロイド蛋白による神経細胞毒性を低減ないし抑制することができ

る。

#### 【0034】

【発明の効果】本発明の $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤は、 $\beta$ -アミロイド蛋白の沈着を伴う神経細胞毒性を顕著に軽減させる作用がある。しかも、これは茶に含まれる天然物であるポリフェノール類を有効成分とするものであるから、安全性が高い上に、経口摂取により体内に取り込ませることができる。そのため、薬剤としての投与だけでなく、日常の飲食物等に添加して利用することもできる。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

// C 0 7 D 311/62

C 0 7 D 311/62

TRANSLATION  
OF JAPANESE  
PATENT

(19) Japanese Bureau of Patents (JP) (12) Public Patent Report (A) (11) Publication NO.:

TokuKaiHei10-245342

(43) Publication date of application: September 14, 1998

---

(51) InL.Cl. <sup>6</sup> :	Discrimination NO.	F1
//CO7D 311/62		CO7D 311/62
A61K 35/78		A61X 35/78
		C
		X
31/35	AAA	31/35
	AAM	AAA
		AAM
	AED	AED

Examination request: Unrequested

Number of inventions: 4 FD (total of 5 pages)

---

(21) Application No. : TokuKaiHei9-61761

(71) Applicant: 591039137

Mitsui Norin Inc.

(22) Application date: March 3, 1997

(72) Inventor:

1-6-7-703 Adachi, Adachi-ku, Tokyo

(72) Inventor:

100-5 Ueno-machi, Hachioji-city, Tokyo

(74) Agent: Attorney

(et al. 1)

(54) [Name of Invention] Diminishing agent of toxicity in nerve cells by  $\beta$ -amyloid protein

(57) [Summary]

[Assignment] Inspecting the physiological effect of the ingredients in tea, which is drunk on a daily basis and pose no health problems at all, and developing a substance that has the effect of diminishing the toxicity of  $\beta$ -amyloid protein against nerve cells.

[Resolutions] A diminishing agent of toxicity in nerve cells caused by  $\beta$ -amyloid protein, which includes tea-polyphenol as an active ingredient, and using a method to diminish the toxicity of  $\beta$ -amyloid protein against nerve cells, featuring prescribed effective doses of the diminishing agent defined in Claim 1 to patients whose nerve cells are impinged by the toxicity of  $\beta$ -amyloid protein.

[Scope of claim]

[Claim 1] A diminishing agent of toxicity against nerve cells caused by  $\beta$ -amyloid protein, which includes tea-polyphenol as an active ingredient.

[Claim 2] Diminishing agent of toxicity against nerve cells described in Claim 1, where tea polyphenol is tea catechin and/or theaflavin.

[Claim 3] The diminishing agent of toxicity against nerve cells described in Claim 2, where tea catechin and/or theaflavin is from at least one of the following: (-)-epicatechin gallate (ECG), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), theaflavin, theaflavin-mono-gallate A, theaflavin-mono-gallate B and theaflavin-di-gallate.

[Claim 4] A method to diminish the toxicity of  $\beta$ -amyloid protein against nerve cells, featuring prescribed effective doses of the diminishing agent described in Claim 1 to patients whose nerve cells are impinged by the toxicity of  $\beta$ -amyloid protein.

[Detailed description of the invention]



[0001]

[Technical field of the invention] The present invention relates to the diminishing agent and its effects on the toxicity against nerve cells caused by  $\beta$ -amyloid protein. More in detail, relates to the diminishing agent of toxicity in nerve cells caused by  $\beta$ -amyloid protein, which includes tea-polyphenol as an active ingredient, and the method to diminish toxicity against nerve cells caused by  $\beta$ -amyloid protein by prescribing the diminishing agent to patients whose nerve cells are impinged by the toxicity of  $\beta$ -amyloid protein.

[0002]

[State of technology prior to invention] Recently, dementia has become a social problem in this aging society. This is especially so with Alzheimer's disease, which constitutes 25% of dementia, and senile dementia of Alzheimer type, which attacks younger people, these material diseases as well as cerebrovascular senile dementia form the core of dementia in the older population. These dementias are progressive and are considered extremely hard to cure. Alzheimer's disease and senile dementia of Alzheimer are morphologically degenerative diseases, where the cerebral cortex or hippocampal cells have been shrunken or reduced. Their noticeable pathological findings are (1) a senile plaque in the cerebral cortex or hippocampal cell, and the deposition of  $\beta$ -amyloid protein, and (2) changing the neurofibril.

[0003] The developing mechanism of Alzheimer's disease is widely believed to be attributed to the toxicity of depositional  $\beta$ -amyloid protein against the nerve cells. The  $\beta$ -amyloid protein is a part of the amyloid precursor protein and it is known that it exists across cell membrane perforating domains and extra-cellular domains and shows toxicity against the nerve cells. Therefore, a chemical compound to diminish the toxicity of  $\beta$ -amyloid protein against nerve cells has been searched, and so far, Vitamin E (C. Behl, J.B. Davis, R. Lesley and D. Schubert, Cell, 77, 817-827 (1994)) and (+) (-) catechin (Kunigami, et al., Summary of the lecture at the Japan Agricultural

Chemistry Society in 1996, p53 (1996)) have been found to have a toxicity-diminishing effect.

[0004] On the other hand, the physiological effect of polyphenol, especially tea catechin or theaflavin contained abundantly in tea, has been studied, and it is reported that they have a cholesterol-controlling effect (TokuKaiHei 2-44449 Open Patent Report) and the inhibitory effect of  $\alpha$ -amylase (TokuKoHei 3-133928 Open Patent Report). However, there has been no such report that tea polyphenol has the effect of diminishing the toxicity of  $\beta$ -amyloid protein against nerve cells.

[0005]

[Challenges the invention wants to resolve] The purpose of the present invention is to investigate the physiological effect of the ingredients in tea, which is drunk on a daily basis and poses no health problems at all, to develop a substance that has the effect of diminishing the toxicity of  $\beta$ -amyloid protein against nerve cells, and to develop a substance that has the effect of diminishing toxicity of  $\beta$ -amyloid protein against nerve cells. The inventors of this invention inspected and the existence of a strong diminishing toxicity effect of  $\beta$ -amyloid protein against nerve cells, thus completing this invention.

[0006]

[Measures to solve the challenges] The said invention described in Claim 1 measures the diminishing agent of toxicity against nerve cells caused by  $\beta$ -amyloid protein. The said invention described in Claim 2 measures the diminishing agent of the toxicity against nerve cells of Claim 1, where tea polyphenol is tea catechin and / or theaflavin. The invention described in Claim 3 is a method to diminish the toxicity of  $\beta$ -amyloid protein against nerve cells, featuring prescribed effective doses of the diminishing agent described in Claim 1 to patients whose nerve cells are impinged by the toxicity of  $\beta$ -amyloid protein.

[0007]

[Embodiments of the invention] Tea polyphenol used in this invention is tea catechin shown in Form I below and theaflavin shown in Form II. These may be used either solely or in combination.

[0008]

[Chemistry 1]

[0009] ( $R_1$  shows either H or OH, and  $R_2$  shows H or

[0010]

[Chemistry 2]

Shows [0011]

[0012]

[Chemistry 3]

[0013] ( $R_3$  and  $R_4$  in the form show H or

[0014]

[Chemistry 4]

[0015] , and  $R_3$  and  $R_4$  could be either the same or different, )

[0016] The followings are examples of tea catechin shown in Form I above.

Epicatechin (EC) ( $R_1=H$ ,  $R_2=H$  in Form 1)

Epigallo catechin (EGC) ( $R_1=OH$ ,  $R_2=H$  in Form 1)

Epicatechin gallate (ECg) ( $R_1=H$ ,  $R_2=$ )

[0017]

[Chemistry 5]

[001A] Epigallocatechin gallate (EGCg) ( $R_1=OH$ ,  $R_2=$ )

[0019]

[Chemistry 6]

[0020] Next, examples of theaflavin shown in Form II above are free theaflavin (TF1) ( $R_3=H$ ,  $R_4=H$  in Form II.)

Theaflavin mono-gallateA (TF2A) ( $R_3=$ )

[0021]

[Chemistry 7]

[0022]  $R_4=H$ )

Theaflavin-mono-gallateB (TF2B) ( $R_3=H$ ,  $R_4$  in Form II)

[0023]

[Chemistry 8]

[0024] Theaflavin-di-gallate (TF3) ( $R_3, R_4$  in Form II)

[0025]

[Chemistry 9]

[0026] The above-mentioned tea polyphenol includes structural properties that can be shown in the same planar structure as in the chemical compound shown in Forms I and II. In the tea catechin shown in Forms I and II, specifically those with 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> configurations of the chemical compound except EC, are cis or trans configuration. Those with 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, and "2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup>" configurations of the theaflavin shown in Form II are cis or trans-configuration. All these are used in the present invention. For the activity of tea polyphenol, the active ingredient of the diminishing agent of toxicity against nerve cells in this invention, the density of EC and EGC that shows the strongest activity is 50  $\mu M$ , the same as (+) - catechin. However, ECg and EGCg have a density of one fifth

of it, and TF1, TF2A, TF2B and "1" F3 at 2/5 of it, showing respectively 5 times and 2.5 times as strong as the activity of (+)-catechin.

[0027] The above-mentioned tea polyphenol contains EGCg and ECg as the main ingredients, and can be produced from tea leaves. Its manufacturing method is described in TokuKaiSho 59-219384 Public Report, TokuKaiSho 60-1370 Public Report, TokuKaiSho 61-130285 Public Report, etc. For example, boil the tea leaves in one of the following solvents: hot water, methanol, ethanol solution, and acetone solution. Dissolve all the extract from the organic solvent, and separate it by dilution from the organic solvent. Furthermore, the concentrate of the extracts that is obtained can be separated into the different substances as mentioned above by using high performance liquid chromatography. Various kinds and forms of tea leaves can be used, such as green tea leaf, non-fermented tea, half-fermented tea, infused tea leaves, instant green tea, or even used tea leaves. Moreover, tea leaves generally contain around 10 % catechin. Theaflavin is contained in black tea, causing its orange color.

[0028] The diminishing agent of toxicity against nerve cells caused by  $\beta$ -amyloid protein in the present invention can be used solely or mixed properly with auxiliary elements for regular use in accordance with the purposes. In other words, it can be mixed properly with diluting agents such as gelatin or sodium alginate, or with solvents such as water or alcohol, or with diluents such as carboxymethyl-cellulose. In the present invention, the diminishing agent of toxicity against nerve cells caused by  $\beta$ -amyloid protein, can be prescribed as oral or non-oral medicine. For example, in the case of oral dosage, it can be taken in various forms, such as with food and drink, or a favorite food such as liquors. They can also be taken with oral hygiene products such as rinse medicine, tooth paste, or troche, and medicine such as internal medicine, powdered medicine, granular medicine, tablet, or capsule, or unregulated drugs. In the case of non-oral prescription, it can be used in liquid form through injections or intravenous drip, or as suppository in solid state or suspension viscous

liquid. For non-oral dosage, topical interstitial administration, hypodermic injection, endodermic injection, intra-muscular injection, intravenous injection as well as external forms of uses such as anal insertion, topical application, and spray, can all be used. The present invention of the diminishing agent of toxicity in nerve cells also can be used as food for livestock.

[0029] The dosage of the said invention of the diminishing agent of toxicity against nerve cells caused by  $\beta$ -amyloid protein can be decided according to its purpose of usage. There is no need to worry about the side effects even if a large amount is given continuously, because the active constituents of this substance are highly safe.

[0030]

[Embodiments] Next, embodiments of the invention will be described in detail. However, the present invention is not limited to these examples.

#### Embodiment 1

Hippocampal nerve cells of embryos from 18-day pregnant female rats were disseminated on the plates with 96 holes with a cell density of  $6 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>. For the culture medium for propagation, a serum-free medium was used, where DMEM medium (product of NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) was added with 0.5% glucose and GMS-A supplement (Made by GIBCO Inc.) at a rate of one supplement for 1 litre of medium. Dialyzed FCS (blood serum of embryos from cows) (made by JRH BIOSCENCE) was added so as to make the density 10 % from the start for 8-10 hours. Then, it is cultured for 5 days at 37°C in serum-free medium.

[0031] 5 days after starting the culture microbe, the medium was changed to a serum-free medium with a certain amount of tea polyphenol (tea catechin or theaflavin), and  $\beta$ -amyloid protein (made by BACHEM) was added at a rate of the final density  $10 \mu$  M. Also, a serum-free medium with only  $\beta$ -amyloid protein added was used in contrast. After cultivating them in these mediums at 37°C for

24-30 hours, the survival rate of hippocampal nerve cells was measured by using the MTT method (toxicity test using tetrazolium salt) ("Manual of Alternative Method of Biological Test" p.51-61 Kyoritu Publishing(1994). Measured value is shown as the number of living cells in the research and control area when the number of living hippocampal nerve cells cultured in the medium with no  $\beta$ -amyloid protein is considered to be 100. The result is shown in Figure 1. In the figure,  $A\beta(-)$  indicates an area with no  $\beta$ -amyloid protein added,  $A\beta(+)$  indicates a control area with only  $\beta$ -amyloid protein added, EC for a test area with a specified quantity of epicatechin, EGC for a test area with a specified quantity of epigallocatechin, ECg for a test area with a specified quantity of epicatechin gallate, EGCg for a test area with a specified quantity of epigallocatechin gallate, TF1 for a test area with a specified quantity of free theaflavin, TF2 for a test area with a specified quantity of theaflavin-mono-gallate B, and TF3 for a test area with a specified quantity of theaflavin-di-gallate. (+)-C shows a control area with added  $\beta$ -amyloid protein and  $50\mu M$  of (+)-catechin.

[0032]

[Figure 1]

Figure 1 Survival Rate of Hippocampal nerve cells

Agent name	Quantity of added agent ( $\mu M$ )						(+)—C	$A\beta(+)$	$A\beta(-)$
	50	25	20	10	5	1			
EC	118.6						96.0	37.8	100
EGC	107.2	72.8			59.5	53.8	81.0	45.7	100



ECg				96.7			96.0	37.8	100
EGCg			108.2	110.7	77.0	56.5	81.0	45.7	100
TF1			93.1	59.7			88.8	50.9	100
TF2A			109.9	68.3			88.8	50.9	100
TF2B			109.2	63.2			88.8	50.9	100
TFg			118.8	69.0			88.8	50.9	100

[0033] As shown in the table, 100% of hippocampal nerve cells survived in the case of tea catechin, when 50  $\mu$  M of EC or EGC was added, and 100% hippocampal nerve cells survived when ECg and EGCg, as the main substance of tea catechin, were added by 10  $\mu$  M. Therefore, it is obvious that gallate type catechin has stronger activity. On the other hand, in the case of theaflavin, 100% of cells survived with 20  $\mu$  M of either theaflavin although TF1 has slightly weaker activity. Thus, tea polyphenol can reduce or control the toxicity against nerve cells caused by  $\beta$ -amyloid protein with a relatively small addition.

[0034]

[Effect of the invention] This invention, the diminishing agent of toxicity against nerve cells caused by  $\beta$ -amyloid protein, reacts to diminish considerably the toxicity against nerve cells accompanying the deposition of  $\beta$ -amyloid protein. Moreover, it is highly safe because its active constituent is polyphenol, which is a natural product contained in tea and also can be taken by ingestion. As a result, it can be added it to daily food and drink in addition to medical prescriptions.